



IMAGENS DIGITAIS DE RAIOS X APLICADAS NA CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E FÍSICA DE FOLHA, SEMENTE E MADEIRA DE FOLHOSAS E CONÍFERAS

¹Vinicius Resende de Castro (vresende@gmail.com), ¹Paula G. Surdi (paula@florestal.eng.br), ²Mario T. Filho (mtomazel@usp.br), ²Gilles Chaix (gilles.chaix@cirad.fr)

¹Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP

Departamento de Ciências Florestais, Avenida Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba - SP

Doutorandos do PPG em Recursos Florestais

² Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP

Departamento de Ciências Florestais, Avenida Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba - SP

Professores do Departamento de Ciências Florestais

RESUMO: A utilização de imagem digital de raios X é uma das mais avançadas metodologias de análise não destrutiva e possibilitando a reconstrução da estrutura anatômica e física por diferenças de tons de cinza da madeira e seus produtos. O trabalho aplicou a análise de imagens de raios X digital por meio do equipamento de raios X Faxitron modelo LX-60, com intensidade de 30 Kv por 19 segundos, para avaliar a anatomia e perfil densitométrico da folha de *Eucalyptus grandis*, semente de *Tectona grandis* e madeira de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. A análise das imagens digitais da estrutura macro e microscópica da folha, semente e madeira em software *ImageJ*, permitiram a construção dos perfis densitométricos. Destacam-se como vantagens da análise de imagens digitais de raios X, em relação a outros métodos de análise anatômica e física, a integridade das amostras após a análise, medições de densidade em intervalos micrométricos, análise rápida e de fácil interpretação.

Palavras Chave: método não destrutivo, raios X, perfil densitométrico, qualidade da madeira, propriedades físico-anatômicas.

DIGITAL X-RAY IMAGES APPLIED IN ANATOMY AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF LEAF, SEED AND WOOD OF HARDWOOD AND SOFTWOOD

ABSTRACT:

ABSTRACT: The use of digital image X-ray is one of the most advanced methods of non-destructive analysis and enabling reconstruction of anatomical structures and physical differences in shades of gray in wood and its products. The work applied to the analysis of X-ray images by digital X-ray equipment Faxitron Model LX-60 with an intensity of 30 kV for 19 seconds to evaluate the anatomy and densitometric profile of the leaf of *Eucalyptus grandis*, seed of *Tectona grandis* and wood of *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. The analysis of digital images of macro and microscopic structure of the leaf, seed and wood by *ImageJ* software, allowed the construction of densitometric profiles. Highlight the advantages of analysis of digital image X-ray, compared to other methods of anatomical and physical analysis, the integrity of samples after analysis, density measurements in micron ranges, quick and easy to interpret.

Keywords: non-destructive method, X-ray, density profile, wood quality, physico-anatomical properties.

1. INTRODUÇÃO

A aquisição de imagens digitais radiográficas fundamenta-se na atenuação de feixes de raios X que, ao atravessar um objeto em análise em diversos ângulos, possibilita a reconstrução da sua estrutura interna. Como técnica não destrutiva, apresenta inúmeras vantagens na análise da madeira e de seus produtos (folhas, sementes, frutos e casca), mantendo a integridade das amostras e dispensando o laborioso processo laboratorial de confecção de lâminas histológicas (BELINI et al, 2011).

O método de análises de imagens digitais radiográficas utiliza os mesmos princípios da densitometria de raios X, fornecendo informações sobre as estruturas internas e à constituição das amostras (presença de extrativos), e estão fortemente correlacionadas com a densidade e o teor de umidade do material que está sendo analisado. Os métodos que utilizam fontes de raios X são empregados para verificar flutuações de densidade dentro e entre anéis de crescimento, podendo ser associado às condições climáticas do passado, estoque de carbono, influencia de fertilização e sequestro de carbono, bem como na qualidade da madeira para diversos fins (BASCIETTO et al., 2004; HUGHES, 2002; MANNES et al., 2007; KEUNECKE et al., 2012; CHERUBINI et al., 2013).

Uma das prioridades atuais da pesquisa sobre análise de imagens de sementes radiografadas é determinar a proporção entre a área ocupada pelo embrião e o espaço disponível na cavidade interna da semente e associar esse parâmetro ao potencial fisiológico. O trabalho de Marcos Filho et al. (2010) visando quantificar o grau de desenvolvimento do embrião em sementes de diversas espécies agrícolas (abóbora, melancia, pepino e algodão), procedeu a análise em equipamento de raios X e posterior observação das imagens no *software ImageJ*, no qual definiu-se o perímetro da semente e o do embrião e foram gerados valores utilizados para expressar a relação percentual entre a área do embrião e a da cavidade interna da semente. Os resultados permitiram determinar o grau de desenvolvimento do embrião das sementes avaliadas, indicando a área embrionária ou do espaço livre existente entre o embrião e o tegumento; sendo esse método de análise uma alternativa viável para avaliar sementes de outras espécies, uma vez que observação da estrutura interna da semente a olho nu torna-se impossível.

As análises que utilizam raios X na avaliação de sementes são vantajosas, já que as sementes não são danificadas, sendo possível examinar sua estrutura e, em seguida, usá-las para testes subsequentes. A análise de raios X é considerada útil para definir critérios mais objetivos, padronizados, e, conseqüentemente, mais precisos do que aqueles que se baseiam exclusivamente na observação humana (CICERO et al, 1998; CARVALHO et al, 1999; ISTA - International Seed Testing Association, 2004). A investigação sobre o assunto resultou em informação valiosa que pode ser utilizada em várias fases da produção de sementes, incluindo: análise de pureza das sementes de aveia (CRAVIOTTO et al, 2002).

A análise de folhas por imagens radiográficas ainda é recente, sendo que a metodologia permite aferir sobre o estado nutricional e déficit hídrico da planta por diferenças de tons de cinza, além da avaliação de área foliar, área e frequência de estômatos.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo aplicar a metodologia de análises de imagens digitais como nova linha de pesquisas em madeira e produtos florestais como folha e sementes, através da análise da estrutura anatômica microscópica e análise física

por meio da densitometria de raios X da folha de *Eucalyptus grandis*, semente de *Tectona grandis* e madeira de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material: Para o presente estudo foram selecionadas folhas de *Eucalyptus grandis*, sementes de *Tectona grandis* e madeira de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* coletados no Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

Seleção e preparo das amostras: As folhas foram coletadas do terço médio de árvores de *Eucalyptus grandis* de plantio de primeira rotação aos 36 meses de idade. As sementes de *Tectona grandis* foram coletadas já caídas no solo. As amostras do lenho de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, foram retiradas de baguetas na altura do DAP, e em laboratório foram seccionadas amostras finas de 2 mm de espessura no sentido transversal ao alinhamento das fibras. As amostras foram acondicionadas em câmara de climatização, 20°C, 24h, 60% U.R., para atingir a faixa de 12 a 15% de umidade relativa (ARIZAPANA-ALMOCINAD, 2013).

Descrição do equipamento e princípio de funcionamento: As amostras foram analisadas juntamente com a escala de calibração de acetato de celulose, ambas inseridas no compartimento interno blindado do equipamento de raios X digital Faxitron modelo LX-60, no qual seguiu-se a sua calibração e leitura automática na faixa de 30 Kv por um tempo máximo de 19 segundos. As imagens geradas, possuíam ultra-contraste e alta resolução, as quais foram salvas em formato TIF (FAXITRON, 2009).

Montagem do perfil radial de densidade aparente do lenho: a partir das imagens de raios X digital da madeira com a escala de calibração, estas foram analisadas no software ImageJ, no qual determinou-se os valores radiais (em intervalos a cada 50 µm) de densidade aparente do lenho obtidos pelo software e foram transferidos para o Excel para construção dos perfis diametrais de densidade aparente do lenho das árvores.

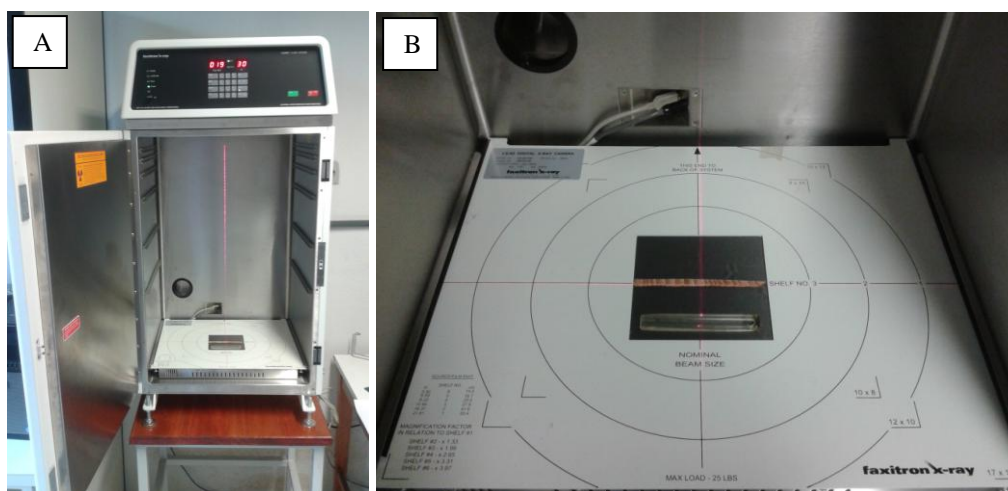


Figura 8 - Obtenção das imagens de raios X Digital. (A) equipamento de raios X Digital LX-60; (B) seção transversal do lenho de Pinus e escala de acetato de celulose

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das imagens radiográficas da estrutura anatômica macro e microscópica da madeira de Pinus sp. no plano transversal possibilitou a visualização dos anéis de crescimento, formados pelos lenhos inicial e tardio, além de falsos anéis de crescimento, finas linhas do parênquima radial e pequenos pontos dos canais de resina (Figura 1B,C,D).

A estrutura anatômica microscópica da madeira de *Pinus* sp. permite analisar e caracterizar um anel de crescimento anual completo com os respectivos lenhos inicial, de transição e lenho tardio e finas linhas de anéis de crescimento falsos, além de dois anéis de crescimento anuais incompletos. Os canais de resina são distintos e localizados em finas linhas de traqueídes de lenho tardio falso, com poucos no lenho inicial; os raios são representados pelas finas e frequentes linhas paralelas perpendiculares aos anéis de crescimento. A caracterização anatômica da madeira de *Pinus* sp. por microCT é corroborada com a descrita na literatura (PANSIN e DE ZEEUW, 1970; FERREIRA, 2009; BELINI, 2011).

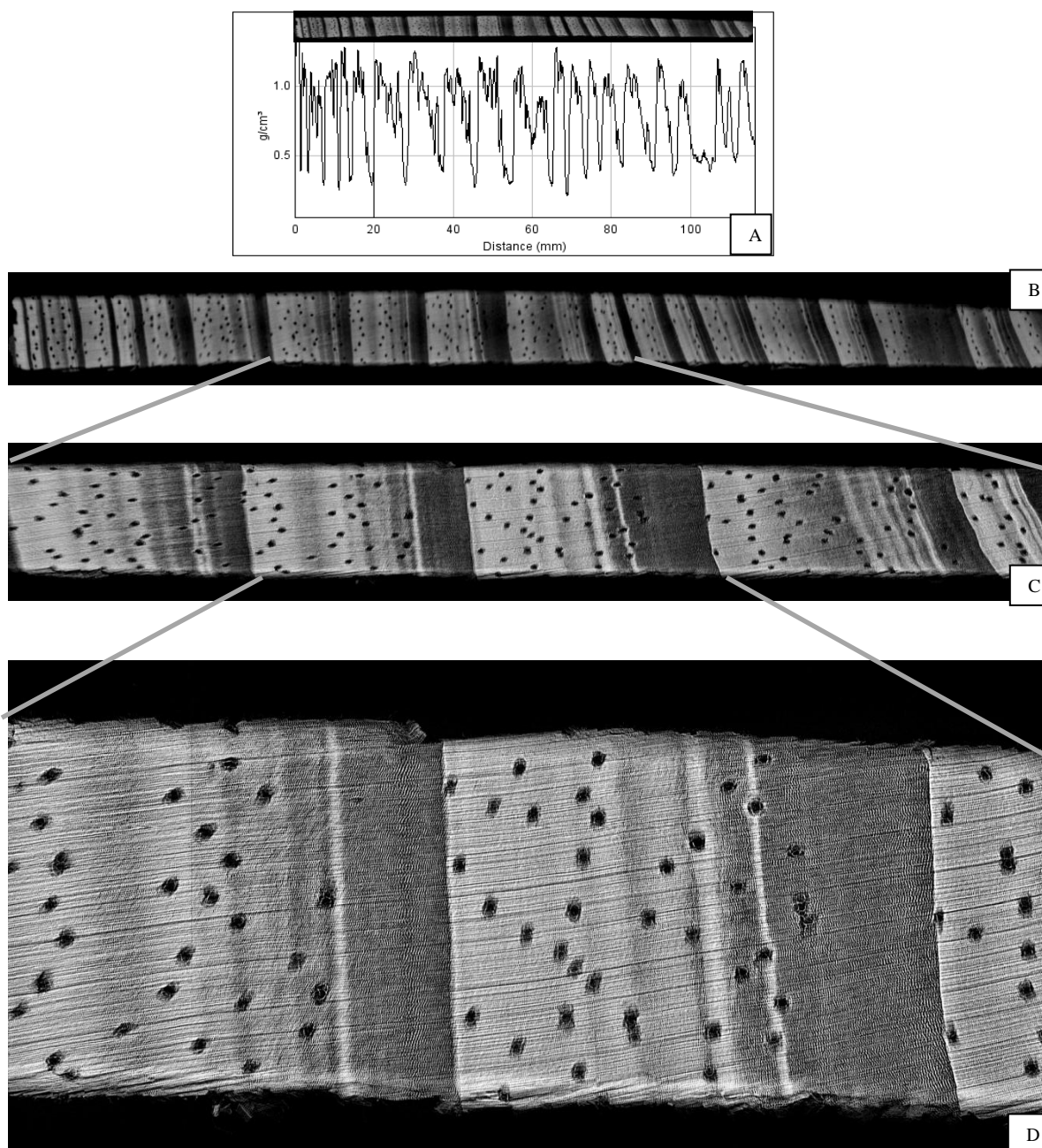


Figura 1. Estrutura física e anatômica do plano transversal da madeira de *Pinus*. A) Perfil densitométrico com a variação de densidade aparente (g/cm^3) ao longo da seção transversal; B,C e D) Detalhe das Imagens de Raios X Digital em escala de cinza

As análises de imagens por meio do equipamento de raios X digital permitiram a identificação de regiões que a olho nu pareciam semelhantes, mas por meio de imagens em

escala de cinza, foi possível verificar variações no grau de escala de cinza com tons mais claros (alta densidade) e mais escuros (baixa densidade), devido à diferença de atenuação dos feixes de raios X (Figura 1A). O método de análises de imagens digitais radiográficas utiliza os mesmos princípios da densitometria de raios X, fornecendo informações sobre as estruturas internas e à constituição das amostras (presença de extrativos), e está fortemente correlacionada com a densidade e o teor de umidade do material que está sendo analisado.

A diferenciação e o contraste dos lenhos inicial e tardio nos anéis de crescimento do lenho de *Pinus* sp. devem-se às regiões próximas ao anel de crescimento, tons mais claros, que se traduzem em regiões de alta densidade, caracterizada pela formação de paredes celulares mais espessas e mais lignificadas, bem como as células epiteliais dos canais de resina. Já regiões caracterizadas pelo lenho inicial com paredes celulares mais delgadas, estas se apresentaram com tons de cinza mais escuros. Os valores de densidade dos lenhos inicial e tardio dos anéis de crescimento de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, obtidos por densitometria de raios X, são da ordem de 0,2-0,5 g/cm³ e 0,8-1,2 g/cm³, respectivamente, corroborando as observações realizadas através da microCT (FERREIRA e TOMAZELLO FILHO, 2009).

Assim como na metodologia de densitometria de raios X, as imagens digitais de raios X em escala de cinza permitiram a diferenciação das camadas de crescimento, permitindo a demarcação e possível contagem de anéis, além de ser um método não destrutivo e de rápida análise, demonstrando ser uma ferramenta importante para estudos de dendrocronologia.

Em estudo de Mannes et al. (2007) comparando a metodologia de microdensitometria de raios X e análises de imagens digitais radiográficas em abetos, concluiu que os métodos são semelhantes, porém a densitometria de raios x possui como desvantagem a leitura linear, ou seja, a leitura do perfil de densidade apenas em uma linha de pontos. Já as imagens de raios X digital permitem uma análise de toda superfície do disco. O autor ainda sugere que as duas metodologias sejam utilizadas em conjunto para pesquisas de anéis de crescimento e variações de densidade da madeira.

A utilização em conjunto das imagens de raios X digital e *software ImageJ* permitiram uma análise qualitativa - variação de cores (tons de cinza) e quantitativa - valores (densidade aparente); sendo de fundamental importância em estudos de qualidade do lenho.

Os tempos e a intensidades de radiação testada possibilitaram a visualização das estruturas internas do fruto da teca (tipo drupa) sendo que dentro das cavidades do fruto, estavam localizadas as sementes, no qual, a baixa umidade do material analisado (12% U.R) favoreceu a visualização das estruturas das sementes durante a análise radiográfica (Figura 2). De acordo com Simak (1991), a umidade das sementes influencia a densidade ótica, ou seja, quanto menor a umidade das sementes, maior a densidade ótica, o que possibilita uma maior diferenciação das estruturas das sementes visualizadas nas radiografias.

As sementes foram consideradas cheias, apresentando assim, qualidade fisiológica satisfatória, que deverá ser comprovada pelo teste de germinação. Verificou-se de acordo com o trabalho de Carvalho et al. (2009) utilizando a mesma metodologia de raios X, que a presença de sementes cheias resulta em germinação de 95 a 100% de plântulas sadias.

As imagens digitais de raios X também permitiram verificar a existência de potenciais defeitos na semente como abortamento do embrião, presença de brocas, sendo este, um indicativo de potencial de viabilidade, que certamente iria inferir na qualidade fisiológica, prejudicando a germinação de tal semente.

Segundo Carvalho e Oliveira (2006), a técnica de radiografia não resolve todos os problemas de detecção da qualidade da semente, mas permite diagnose rápida e não destrutiva, na maioria dos casos, fornecendo informações atuais, úteis e essenciais para trabalho científico e controle de qualidade de sementes.

A análise do perfil densitométrico na posição superior do fruto possibilitou determinar a densidade da casca do fruto que envolve a semente, verificando que se trata de um material frágil (quebradiço) e baixa densidade (abaixo de 0,2 g/m³). Já a o perfil de densidade

passando pelo centro do fruto, atingiu desde a casca externa, passando pela testa da semente até chegar ao tegumento da semente. Verifica-se nesta posição, que a semente possui alta atenuação do feixe de raios X atingindo valores de densidade de até 3 g/cm³.

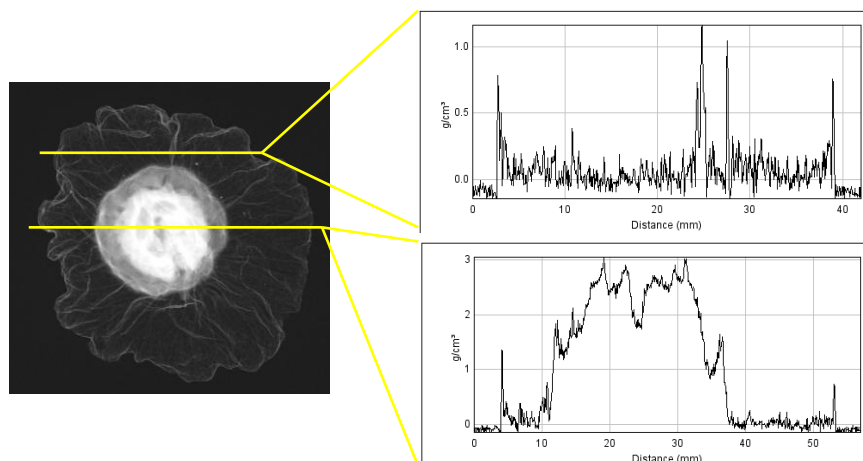


Figura 2 - Estrutura anatômica e física do plano transversal do fruto com a semente de teca. As duas linhas (posição superior e mediana do fruto) determinam o perfil de densidade aparente

A análise de folha de *Eucalyptus grandis* por imagens radiográficas permitiu aferir sobre a área foliar, o tamanho e a frequência de estômatos (n^o/mm²), além do perfil de densidade aparente ao longo da folha. Verifica-se por diferenças de tons de cinza que o pecíolo e a nervura principal, possuem densidade diferente do restante da folha demonstrada pela tonalidade mais clara na imagem radiográfica. Além disso, as posições marginais da folha também possuem uma tonalidade levemente mais clara, representando variações de densidade da periferia para o centro.

Os perfis de densidade em 3 posições ao longo da folha exemplificam melhor essa variação. Na parte inferior da folha, verifica-se que a nervura principal possui alta atenuação de raios X com valores de densidade de até 0,55 g/cm³, já no limbo os valores mais altos nas margens (próximo a 0,12 g/cm³), diminuindo até a nervura principal. As variações de densidade encontradas da margem à nervura principal refletem a variação de densidade das nervuras secundárias, estômatos, cloroplastos, entre outros componentes da epiderme do limbo foliar.

Na posição mediana da folha verifica-se uma queda dos valores de densidade apenas na posição da nervura principal (0,28 g/cm³). Já na posição mais superior da folha, os valores dos picos de densidade na margem e na nervura principal são praticamente iguais (0,10 g/cm³). Tal análise permite concluir que a maior variação de densidade na folha se deve à nervura principal que diminui ao sentido base à ponta da mesma. Além disso, a variação de densidade da margem para o centro da folha aumenta no mesmo sentido.

A área foliar que pode ser verificado por imagens radiográficas e software de imagem, é um indicativo da situação de estresse que a planta se encontra, seja déficit nutricional ou hídrico. Muianga (2013) verificou diferenças significativas na área foliar em diferentes tratamentos com doses de potássio em árvores de eucalipto.

A avaliação do diâmetro e frequência dos estômatos pode auxiliar em estudos potencial hídrico e disponibilidade de água em diferentes posições de galhos, altura da árvore e até na própria folha, relacionando assim, o comportamento dessas variáveis ao crescimento da planta (altura, DAP, área da copa).

O estudo de Lintern et al. (2013) utilizando a metodologia de imagens digitais de raios X demonstrou a capacidade das folhas de eucalipto indicar regiões que possam ter jazidas de ouro no solo, no qual os pesquisadores afirmaram que os eucaliptos são capazes de fincar suas raízes em camadas profundas do solo em busca de água, atingindo áreas ricas em ouro, absorvendo partículas microscópicas do metal enquanto sorvem água. Segundo eles, o ouro pode ser absorvido pelas raízes e viajar pelo tronco da árvore até chegar às suas folhas, ainda que em concentrações muito pequenas. O trabalho demonstrou traços de ouro em folhas de eucalipto utilizando a metodologia de raios X, ressaltando que a metodologia pode levar a explorações bem sucedidas e manter a continuidade de oferta de ouro.

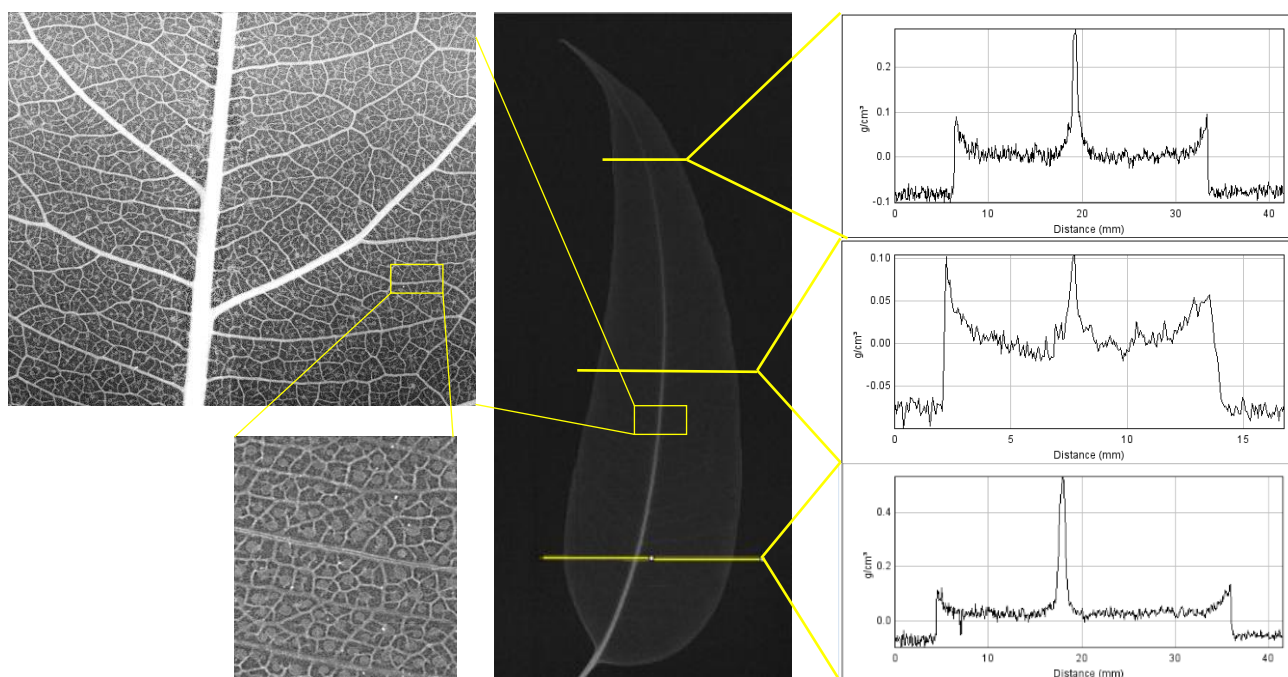


Figura 3 – Imagens radiográficas da folha de *Eucalyptus grandis*. Análise anatômica e física pelos perfis radiográficos em diferentes posições

4. CONCLUSÃO

A aplicação das metodologias de densitometria de raios X e análise de imagens de raios X digital possibilitaram a obtenção de imagens da estrutura anatômica macro e microscópica da madeira de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, semente de *Tectona grandis*, e folha de *Eucalyptus grandis*, permitindo a sua caracterização, descrição e comparação com a da literatura especializada.

A aplicação de metodologias que utilizam imagens radiográficas apresenta inúmeras vantagens, como método não destrutivo, em relação ao processo de laboratoriais tradicionais. Tais análises inovadoras permitem, ainda, a avaliação quantitativa e qualitativa das propriedades anatômicas e físicas de produtos florestais.

5. REFERÊNCIAS

ARIZAPANA-ALMONACID, M.A. **Avaliação do crescimento e da qualidade do lenho de árvores de *Eucalyptus urophylla*, de 8 anos, de teste de progênies, visando a produção de carvão vegetal.** 2013. 159. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais - Tecnologia de Produtos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

- BASCIETTO, M.; CHERUBINI, P.; SCARASCIA-MUGNOZZA, G. Tree rings from a European beech forest chronosequence are useful for detecting growth trends and carbon sequestration. **Canadian Journal Forest Resource**, v. 34, p.81–492, 2004.
- BELINI, U.L.; TOMAZELLO FILHO, M.; CASTRO, V.R.; MUNIZ, G.I.B.; LASSO, P.R.O.; VAZ, C.M.P. Microtomografia de raios X (microCT) aplicada na caracterização anatômica da madeira de folhosa e de conífera. **Floresta e Ambiente**, v. 18, n. 1, p. 30 - 36, 2011.
- CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M. Raios X na avaliação da qualidade de sementes. **Informativo Abrates**, Brasília, DF, v.16, nº1, 2,3, 2006.
- CARVALHO, M.L.M.; AELST, A.C.V.; ECK, J.W.V.; HOEKSTRA, F.A. Pre-harvest stress cracks in maize (*Zea mays* L.) kernels as characterized by visual, X-ray and low temperature scanning electron microscopical analysis: effect on kernel quality. **Seed Science Research**, v.9, n.3, p.227-236, 1999.
- CARVALHO, M. L. M.; SILVA, C. D.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, D. G.; CALDEIRA, C. M. Teste de raios x na Avaliação da qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 2, p.221-227, 2009.
- CHERUBINI, P.; HUMBEL, T.; BEECKMAN, H.; GARTNER, H.; MANNES, D.; PEARSON, C.; SCHOCH, W.; TOGNETT, R.; Olive Tree-Ring Problematic Dating: A Comparative Analysis on Santorini (Greece). **Plos One**, v. 8, n.1, p.1-5 2013.
- CICERO, S.M.; VAN DER HEIJDEN, G.W.A.M.; VAN DER BURG, W.J.; BINO, R.J. Evaluation of mechanical damages in seeds of maize by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, v.26, n.3, p.603-612, 1998.
- CRAVIOTTO, R.M.; YOLDJLAN, A.M.; SALINAS, A.R.; ARANGO, M.R.; BISARO, V.; MATURO, H. Description of a pure seed fraction of oat through usual evaluations and radiographic images. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.8, p.1183-1188, 2002.
- FAXITRON, 2009. User Manual Faxitron DX Radiography System, 95p.
- FERREIRA, A.T.B. **Caracterização da estrutura do lenho, dos anéis de crescimento e dos canais de resina de árvores de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. et Golf**. 2009. 84 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- FERREIRA, A. T. B.; TOMAZELLO FILHO, M. Caracterização dos anéis de Crescimento de árvores de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. et Golf. por densitometria de raios X. **Scientia Forestalis**; v. 37, n.83, p.287-298, 2009.
- HUGHES, J.F.; SARDINHA, R.M.A. The application of optical densitometry in the study of wood structure and properties. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 104, n. 1, p. 91-103, 1975.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). **International rules for seed testing**. 174p. 2004.
- KEUNECKE, D.; NOVOSSELETZ, K.; LANVERMANN, C.; MANNES, D.; NIEMZ, P. Combination of X-ray and digital image correlation for the analysis of moisture-induced strain in wood: opportunities and challenges. **European Journal Wood Products**, v. 70, p.407–413, 2012.
- MANNES, D.; LEHMANN, E.; CHERUBINI, P.; NIEMZ, P. Neutron imaging versus standard X-ray densitometry as method to measure tree-ring wood density. **Trees**, v.21, p.605–612, 2007.
- MARCOS FILHO, J.; GOMES JR. F. G.; 3, BENNETT, M. A.; WELLS, A. A.; STIEVE, S. Using tomato analyzer software to determine embryo size in x-rayed seeds . **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 32, nº 2, p. 146-153, 2010.
- MUIANGA, M. R. D. **Relação entre crescimento e respostas ecofisiológicas em clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* submetidos à diferentes doses de adubação potássica**. 2013. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais - Tecnologia de Produtos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- PANSHIN, A.J.; DE ZEEUW C. *Text book of wood technology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1970.

- SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. In: Tree and shrub seed handbook. Chapter 14. **International Seed Testing Association**. (ISTA), Zurich, Switzerland. 1991.
- LINTERN, M.; RAVI ANAND, R.; RYAN, C; PATERSON, D. Natural gold particles in Eucalyptus leaves and their relevance to exploration for buried gold deposits. **Nature Communications**, Austrália, 2013, 8p. DOI: 10.1038/ncomms3614
|www.nature.com/naturecommunications

6. NOTA DE RESPONSABILIDADE

Os autores são os únicos responsáveis pelo o que está contido neste trabalho.